

Rec'd PCT/PTO 26 JAN 2005

PCT/JP 03/09563

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

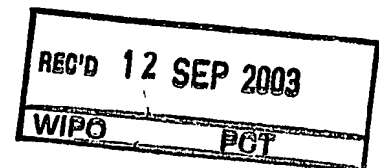
23.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 7月30日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-221232
[ST. 10/C]: [JP 2002-221232]



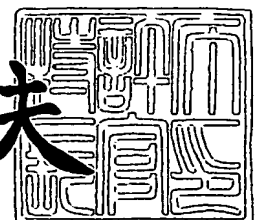
出 願 人
Applicant(s): 理化学研究所
科学技術振興事業団

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 JP3343RIK

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 38/00
C12N 15/09
C07K 16/00

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

【氏名】 太田 邦史

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

【氏名】 瀬尾 秀宗

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

【氏名】 柴田 武彦

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100109726

【弁理士】

【氏名又は名称】 園田 吉隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100101199

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 義教

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 058621

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 体細胞相同組換えの促進方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 遺伝子座において DNA 相同組換えが起きている体細胞の相同組換えを、該体細胞の染色体におけるクロマチン構造を弛緩させることによって促進することを特徴とする、体細胞相同組換えの促進方法。

【請求項 2】 抗体遺伝子座において DNA 相同組換えが起きている免疫細胞から抗体を作製するに当たり、該免疫細胞の染色体におけるクロマチン構造を弛緩させることによって、抗体遺伝子座における DNA 相同組換えを促進させ、それによって多様な抗体を獲得することを特徴とする抗体作製方法。

【請求項 3】 染色体のクロマチン構造の弛緩を、細胞をヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤と接触させて処理することにより誘導することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】 阻害剤がトリコスタチン A であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 トリコスタチン A の処理濃度が約 0.5 ng/ml から約 2.5 ng/ml であり、接触処理時間が約 2 週間から約 5 週間であることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 細胞が DT40 培養細胞であることを特徴とする請求項 1 ないし 5 に記載の方法。

【請求項 7】 請求項 1、3、4、5 又は 6 のいずれか 1 項に記載の方法により遺伝子座における体細胞相同組換えが促進された免疫細胞。

【請求項 8】 請求項 2 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法により作製された多様な抗体。

【請求項 9】 作製された抗体が IgM である請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】 遺伝子座における体細胞相同組換えを促進するための薬剤であって、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤からなる薬剤。

【請求項 11】 阻害剤がトリコスタチン A である請求項 10 に記載の薬剤。

。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、一般には体細胞相同組換えを促進する技術に係り、より詳細には体細胞中の遺伝子座における体細胞相同組換えを促進する方法及びかかる方法によって体細胞相同組換えが促進された免疫細胞に関する。

また、本発明は、前記の体細胞相同組換えの促進方法を利用して多様な抗体分子を作製する方法並びにかかる方法によって作成された多様な抗体にも関する。

さらに、本発明は体細胞相同組換えを促進するために使用して好適な薬剤にも関する。

【0002】**【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】**

従来、体細胞相同組換えは、遺伝子の多様性を産み出す要因の一つであると考えられている。例えば、ニワトリ由来のB細胞培養株では、抗体遺伝子座においてDNA組換えが起きていることが知られている (Buerstedde et al. EMBO J. (1990) 9:921-927)。このようなDNA組換えを利用して種々のタンパク質因子を人工的に創り出すことが考えられるが、実際にはその組換え頻度は非常に低く、そのままではタンパク質因子の創製に利用することは困難であった。

【0003】

また、抗体を作製する場合、通常ウサギやマウスなどの動物を利用するのが一般的であり、さらに多様な抗体を獲得することが望まれる場合には、多数の動物個体に対して抗原を免疫しなければならなかった。また、得られる抗体の力価も動物の個体差、抗原の性質に依存していたため、多様で高力価の抗体を安定して得ることは困難であった。

そこで、前記ニワトリ由来のB細胞株等において生じているDNA相同組換えを利用して抗体を獲得することが考えられ、原理的にはこの手法により多様な抗体の合成が可能となると考えられる。しかし、上述の様に、DNA相同組換え頻度が極めて低いため、特定の抗原に対する抗体を培養細胞により人工的に作製することは現実的には極めて困難であると考えられていた。

【0004】

一方、近年、XRCC2及びXRCC3のノックアウトDT40細胞株（ニワトリ由来のB細胞株）において、体細胞突然変異の頻度が増加するという報告がなされている（Sale et al. Nature (2001) 412:921-926）。このような体細胞突然変異を利用することも想定されるが、体細胞突然変異は生体内においては親和性の成熟（affinity maturation）の為に二次的に利用されるものであることから、抗体の特異性を大規模に変えることは困難であると思われる。

【0005】

本発明者らは、上記事情に鑑みて、所望の体細胞相同組換えを制御された状況下で誘起促進させる方法がないかについて鋭意研究した結果、意外にも、免疫細胞の染色体のクロマチン構造を弛緩させることで、体細胞相同組換えの頻度を大幅に高めることが可能になることを見出した。

よって、本発明は、一般には、体細胞中の遺伝子座における体細胞相同組換えを促進する方法を提供することを目的とする。

また、本発明は上記方法によって体細胞相同組換えが促進された免疫細胞を提供することを目的とする。

さらに、本発明は、免疫細胞において生じている体細胞相同組換えを利用して多様な抗体を獲得することを可能にする抗体作製方法を提供することを目的とする。

またさらに、本発明は上記抗体作製方法により作製された多様な抗体を提供することを目的とする。

加えて、本発明は体細胞相同組換えを促進するために使用して好適な薬剤を提供することを目的とする。

【0006】

【課題が解決するための手段】

しかして、本発明においては、遺伝子座においてDNA相同組換えが起きている体細胞の相同組換えを、該体細胞の染色体におけるクロマチン構造を弛緩させることによって促進することを特徴とする体細胞相同組換えの促進方法が提供される。またかかる方法によって体細胞相同組換えが促進された免疫細胞も提供さ

れる。

また、本発明においては、抗体遺伝子座においてDNA相同組換えが起きている免疫細胞から抗体を作製するに当たり、該免疫細胞の染色体におけるクロマチン構造を弛緩させることによって、抗体遺伝子座におけるDNA相同組換えを促進させ、それによって多様な抗体を獲得することを特徴とする抗体作製方法が提供される。また、かかる方法によって作成された多様な抗体も提供される。

抗体遺伝子の多様性の獲得という観点では、相同組換えは、突然変異よりも高効率であることが知られており、X R C C 2 / X R C C 3 の変異株(Buerstedde et al., EMBO J. (1990) 9:921-927; Sal et al., Nature (2001) 412:921-926) と比べると、より容易に抗体の高い多様性を獲得し得ると考えられる。抗体遺伝子座における体細胞相同組換えが促進された細胞であって、目的の抗体を産生する細胞が得られれば、当該細胞を培養し、維持していくことで、目的の抗体をいつでも簡便に調製することが可能となる。従って、将来的には実験動物を使わずに、あらゆる抗原に対して高力価な抗体を作製する技術の確立が期待でき、病気等の治療に役立つ抗体等を高力価で継続的に提供することが可能となる。

【0007】

本発明において使用できる免疫細胞としては、抗体遺伝子座において体細胞相同組換えが生じる細胞であれば如何なるものでも使用可能であると思われるが、好適にはニワトリ由来のB細胞株であるDT40細胞が使用される。

クロマチン構造を弛緩させるための手段は、当業者において周知である如何なる手段でも可能であると思われるが、好ましくはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を対象の細胞に接触させる処理を用いることができる。かかる阻害剤はヒストン脱アセチル化酵素を阻害すれば如何なるものでもよいが、好ましくはトリコスタチンAが利用される。

また、クロマチン構造を弛緩させる方法としてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に免疫細胞を接触させる場合、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤での処理濃度及び処理時間は、接触させる細胞が死に至らない範囲内であれば、使用可能である。具体的には、トリコスタチンAの場合には、処理濃度は約0.5 ng/ml から約2.5 ng/ml が好ましく、処理時間としては約2週間から約5週間が

好ましい。

【0008】

またさらに、本発明においては、遺伝子座における体細胞相同組換えを促進するための薬剤であって、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤からなる薬剤が提供される。

本発明における薬剤としては、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であれば如何なるものでも使用可能であるが、トリコスタチン A が最も一般的でかつ好適である。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の抗体作製方法は体細胞相同組換えの促進方法を一部に利用するものであるので、以下では抗体の作製方法について詳細に説明する。

前述のように、本発明の抗体作製方法においては、抗体遺伝子座において DNA 相同組換えが起きている免疫細胞を選択して培養し、抗体を作製するにあたり、該免疫細胞の染色体におけるクロマチン構造を弛緩させる操作を行うことによって、抗体遺伝子座において起きている DNA 相同組換えの頻度を大幅に向上させ、それによって多様な抗体を獲得する。

よって、以下では、細胞培養、クロマチン構造の弛緩の誘導、クロマチン構造の弛緩の確認、相同組換えの確認、抗体の発現の確認について順に説明する。

【0010】

細胞培養：

本発明における「免疫細胞」とは、抗体産生能を有する B 細胞を指し、宿主動物の種類としては、マウス、ヒツジ、ラット、ニワトリなどが含まれる (Honjo, T., Alt, F.W. (1995). Immunoglobulin Genes, 2nd Edition (Academic Press))。好ましくは、株化された細胞が使用され、特に好ましくは免疫細胞としては DT40 細胞が使用される。

「DT40 細胞」とは、ニワトリ由来 B 細胞の株化培養細胞であり、当該細胞の保有する染色体に何らかの修飾 (例えば、特定の遺伝子の組換え、挿入、削除等) を加えられた、誘導體株、サブライン (Subline) も含む。

本発明で用いる細胞の培養条件は当該技術分野において周知の方法によって行われるが、選択される免疫細胞に適した培地、培養条件（培養温度、CO₂濃度）下で行われることは言うまでもない。しかして、選択される免疫細胞がDT40細胞である場合、例えば、培地はIMDM（Invitrogen社）を用い、培養温度は例えば39.5℃、5%のCO₂濃度条件下で行う。培養は、細胞濃度を一定に保ちながら行い、適当な期間毎（例えば、日毎、週毎）に目的の細胞の抗体遺伝子座における体細胞相同組換えの有無を確認する。

【0011】

免疫細胞の抗体遺伝子座におけるクロマチン構造の弛緩の誘導：

ここで用いられる「クロマチン構造の弛緩」とは、標的の遺伝子座（ここでは、抗体遺伝子座）に、相同組換えに関与する各種因子が直接或いは間接的に作用し得るように、当該遺伝子座全体のクロマチン構造を緩めることをいう。「弛緩」を引き起こす因子には、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、クロマチン構造変換因子（例えば、Swi/Snfタンパク質、Iswiタンパク質、及びこれらのホモログ、及びこれらの機能複合体）などが含まれる。好ましい「弛緩」を引き起こす因子は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である。

「ヒストン脱アセチル化阻害剤」には、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の活性を抑制する活性を持つ抗体などのタンパク質因子、トリコスタチンA、ブチル酸及びバルプロ酸など小分子化合物など、当業者に知られているものであれば如何なるものも使用可能であると思われるが、最も好適にはトリコスタチンAが使用される。

【0012】

免疫細胞の抗体遺伝子座におけるクロマチン構造を弛緩させるために、弛緩を誘導する因子を、目的の免疫細胞中で発現させ又は該細胞と直接接触させる。弛緩を誘導する因子がタンパク質性の因子であって、細胞内で該因子を発現させてクロマチン構造の弛緩を誘起する場合、目的の細胞における該因子の発現によって適切なプロモータ、ターミネータ、エンハンサー等を保持するベクターを目的の細胞に形質移入することにより達成される。該因子の免疫細胞内での発現は当

業者にとって周知の方法によって容易に実施することが可能である (Spector, D. L., et al. (1998). Cells a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press) を参照のこと)。弛緩を誘導する因子を目的の免疫細胞に直接接触させる場合は、該因子の濃度を一定に保ちながら培養する。弛緩を誘導する因子を発現させ又は接触させた細胞は、抗体遺伝子座における体細胞相同組換えを引き起こすために適切な時間、培養する。例えば、該因子がヒストンアセチル化酵素阻害剤のトリコスタチン A である場合、抗体遺伝子座における体細胞相同組換えを引き起こすために適切な時間は、好ましくは、約 2 週間から約 5 週間、最も好ましくは 5 週間、であり、適切な濃度は、好ましくは、約 0.5 ng/ml から約 2.5 ng/ml であり、最も好ましくは、1.25 ng/ml である。

【0013】

抗体遺伝子座におけるクロマチン構造変化の検出:

特定の遺伝子座領域におけるクロマチン構造の変化は、当該領域に対する DNase 感受性を指標として検出するのが一般的である。上述した方法による処理を行った細胞において、目的の遺伝子座領域のクロマチン構造が弛緩すると、その部分における DNA 及びクロマチン構成タンパク質 (ヒストン等) 間の結合に緩みが生じると考えられる。その結果、クロマチン構成タンパク質と結合していたために DNase により切断されなかった DNA 部分が、クロマチン構造の弛緩により緩むことで、DNase に対して感受性を示すようになる。クロマチン構造の変化の前後における、DNase に対する感受性の変化は、当該領域の DNA 切断パターンを変化させることとなり、新たに生じた DNA 断片をサザンブロット法等で検出することで、クロマチン構造が弛緩した遺伝子座領域を確認することができる。ここで、DNase としては、DNase I、MNase (球菌ヌクレアーゼ) などが一般的に用いられる。

【0014】

抗体遺伝子座における体細胞相同組換えの確認:

体細胞相同組換えの確認は、上述した方法による処理を行った細胞の抗体遺伝子座領域のゲノム配列を決定し、上述の処理を行っていないコントロールの細胞の抗体遺伝子座領域のゲノム配列と比較することで行う。抗体遺伝子座領域のゲ

ノム配列の決定方法として、一般的には、該遺伝子領域を特異的なDNAプライマーにより増幅し、増幅されたDNA断片を適当な配列決定用のベクターに組込んで配列決定を行う。簡単には、目的の免疫細胞から調製したゲノムDNAの抗体遺伝子座領域を増幅するのに必要なDNAプライマー（例えば、目的の抗体遺伝子領域全体を含むように、該遺伝子の5'側近傍に正方向のプライマーを設計し、該遺伝子の3'側に逆方向のプライマーを設計する）を用意し、抗体遺伝子座領域をPCR法により増幅させる。増幅させる抗体遺伝子座領域は、抗体軽鎖遺伝子又は/及び抗体重鎖遺伝子のどちらかであり、好ましくは、何れかの遺伝子の可変領域がよい。増幅に使用されるDNAポリメラーゼは市販のものをを用いることができるが、長いDNA鎖の伸長が可能で、かつ正確性の高いものを使用することが望ましい。抗体遺伝子座領域の増幅を行うための条件は、使用するDNAプライマーのアニール温度、使用するDNAポリメラーゼの性質等に依存するが、例えば、98℃2分間の反応後、98℃30秒、57℃30秒、72℃1分を27サイクル、さらに72℃で15分間反応させる。反応後の増幅産物は、アガロースゲル電気泳動で分離し、目的抗体遺伝子座領域を含むDNAのバンドを切り出し、DNAを回収後、配列決定用のベクターへ組込む。配列決定用のベクターは当該技術分野で用いられる如何なるベクターであつてもよいが、例えば、pCR2.1-TOPO (Invitrogen社) などが用いられる。上記調製された配列決定用のベクター中の、抗体遺伝子座領域のDNA配列を解析し、抗体遺伝子座における体細胞相同組換えを誘導していない細胞由来の対応配列と比較して、体細胞組換えの程度を測定する。

【0015】

抗体の発現の確認:

上述の記載に従い抗体遺伝子座における体細胞相同組換えが確認された細胞について、実際に抗体の発現が誘導されていることを確認する。

「多様な抗体」には、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが含まれる。

(i) 分泌された抗体の確認

体細胞相同組換えが行われた遺伝子座に由来する抗体が分泌型の場合、産生さ

れた抗体分子を含む培養上清について目的の抗体分子の存在を確認する。確認の方法としては、当業者にとって周知の如何なる方法によっても実施することが可能であるが、例えば、産生された抗体分子を特異的に認識する抗体による検出法（例えば、標識化した二次抗体を用いる、ウェスタンブロット法、エライザ法など）が一般的である。簡単には、培養上清をそのまま、ウェスタンブロット法、又はエライザ法等に用いることができる。産生された抗体の濃度が低い場合には、該培養上清から目的の抗体を濃縮した後、産生された抗体の確認を行うことができる。簡単には、該培養上清から硫酸沈殿法（50%硫酸）等により抗体分子を濃縮沈殿させ後、抗体分子のペレットを適当なバッファー（例えば、PBSなど）に懸濁後、同バッファーに対して透析する。透析は透析外液を数時間毎に代えながら、硫酸が除かれるまで行う。得られた抗体分子に対して、当該抗体分子を特異的に認識する抗体を用い、ウェスタンブロット法により直接又は間接的に産生抗体分子の検出を行う。あるいは、産生される抗体がIgGである場合には、プロテインA又はプロテインGを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより直接精製することで確認してもよい。

(ii) 細胞膜上に発現されたIgMの確認

体細胞相同組換えの促進により産生された抗体が、細胞膜上に提示されるIgMの場合、抗IgM抗体を用いた蛍光活性化セルソーター（FACS）分析によって確認することができる。

【0016】

【発明の効果】

本発明に係る体細胞相同組換えの促進方法によれば、所望の体細胞相同組換えを制御された状況下で誘起促進させることができ、よって、例えばタンパク質因子の創製に利用することが可能になる等の効果を奏する。

また、本発明に係る抗体作製方法によれば、培養細胞を用いて人工的に多様な抗体を作製することができるという効果を奏する。

さらにまた、特定の疾病の治療に有効な抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体等）を生産するために作成された免疫細胞株（US Patent A1 20020028488）を用いることで、より治療効果を発揮する多様な抗体を、培養細胞系の利用により簡

便かつ継続的に確保することができるという効果も奏する。

【0017】

【実施例】

以下に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0018】

実施例 1：トリコスタチン A (TSA) 処理後の DT40 細胞の抗体遺伝子座領域におけクロマチン構造の解析

TSA により実際に抗体軽鎖遺伝子のクロマチン構造に変化が生じているかどうかは、球菌ヌクレアーゼ (MNase) 感受性を指標とし、間接末端標識法を用いて解析した。ニワトリ抗体遺伝子には VJ 組換えを起こしたものと起こしていないものが存在するが、実際に抗体産生において機能しているのは VJ 組換えを起こした側のみである事が知られている。しかしながら両者の配列は、ほぼ同一であることから、間接末端標識法をそのまま適用するだけでは、野生型 DT40 細胞の、VJ 組換えを起こした遺伝子座のみを解析することは困難である。この問題を解決するために、VJ 組換えを起こしていない側において、サザンハイブリダイゼーションのプロープとして用いる領域の周辺配列を欠失した変異株を作製し、この変異株を用いて MNase 感受性の解析を行った。

【0019】

欠失変異株の作製：

抗体軽鎖遺伝子をクローニングしたプラスミド #18-4 (京都大学医学系研究科、武田俊一教授より譲渡されたもの) を EcoRI で消化し、二つ生じる断片のうち、大きい方とプラストサイシン耐性遺伝子 (武田教授より譲渡されたもの) 断片をライゲートし、大腸菌にトランスフォームした。これにより、定常領域及びサザンハイブリダイゼーションのプロープとして用いる領域を含む領域が欠失し、それに代わりプラストサイシン耐性遺伝子が挿入されたプラスミド (UR1) が得られた (図 1)。このプラスミド約 20 μ g を XbaI で消化して直線化し、既知の手法 (Buerstedde, J.M., Takeda, S. Cell. 1991 67(1):179-88.) に従って DT40 細胞に感染させ、欠失変異をもつ DT40 細胞株 (3H12) を作製した。

核の単離：

TSA (0 ng/ml, 0.625 ng/ml, 1.25 ng/ml, 2.5 ng/ml) を加えた培地で8時間培養した 10^7 - 10^8 の3H12細胞含む培養液を300 g, 15分遠心し、細胞を回収したのち、10 mlのPBSに懸濁し、再び300 gで15分遠心してペレットに回収した。その後、細胞を4 mlのNuclear Buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.32 M Sucrose, 5 mM MgCl₂, 1% TritonX-100, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF) に懸濁後、氷上で15分間放置して細胞膜を除去した。1000 gで5分間遠心することで核を回収した。

【0020】

MNase 消化:

核のペレットをRSB (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF) 10 mlに再懸濁した。再び1000 gで5分間遠心して核を回収し、400 μ lのRSBに懸濁した。この核懸濁液のDNA濃度をHoechst 33258の結合で測定し、100 μ g相当の懸濁液をRSBで500 μ lにした。これを各細胞ごとに4本ずつ用意した。0.5 μ lの1 M CaCl₂、さらにMNase (0 U, 0.04 U, 0.2 U, 1 U) を加え、37℃で5分間消化後、20 μ lの0.5 M EDTAと12.5 μ lの20% SDS、2 μ lの15 mg/ml プロテイナーSを加え、50℃で一晩反応させた。500 μ lのフェノールクロロホルムを添加し、30分間、穏やかに震盪させた後、1.5 K rpmで5分間遠心し、上層を回収し、新しいチューブに移した。クロロホルム500 μ lをさらに加えて再び30分間、震盪させ、1.5 K rpmで5分間遠心したのち、上層を新しいチューブに移した。50 μ lの3 M 酢酸ナトリウム、1 mlの冷エタノールを加え、穏やかに混ぜた。1.5 K rpmで20分間遠心し、上清を除去後、80% エタノールを500 μ l加えて穏やかに混ぜ、再び1.5 K rpmで5分間遠心した。上清を除去し、沈澱を風乾させた。ここに100 μ lのTE (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA) を加え、55℃で1時間保温し、その後4℃で一晩放置して溶解させた。

【0021】

サザンプロット解析:

サザンプロット解析は、Church及びGilbert (Church, G.M., Gilbert, W. Pro

c. Natl. Acad. Sci. U S A. 1984 81(7):1991-5.) の方法で行った。20 μ g相当のDNAをスピンカラム (ファルマシア社ProbeQuant G-50) で精製した後、制限酵素BsaAI (NEB社)で消化した。その後フェノールクロロホルム抽出を行い、エタノール沈澱でDNAを回収したのち、TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA) バッファー中、1.5%アガロースゲルで電気泳動を行った。DNAはVacu Gene XL nucleic blotting system (Pharmacia) によりメンブレンにトランスファーした。最初に変成バッファー (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) で15分間変成させ、次にトランスファーバッファー (1.5M NaCl, 0.25M NaOH) で4時間かけてトランスファーした。メンブレンは20xSSCで中和した後、ハイブリダイゼーションバッファー (10mg/ml BSA, 0.5M Na₂PO₄ (pH7.4), 7% SDS, 1mM EDTA) で62℃、1時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、[α -³²P]dCTPでラベルしたプローブ50ngをハイブリダイゼーションバッファーで62℃、一晩、ハイブリダイズさせた。その後、メンブレンを65℃に加温したWash Buffer (20mM Na₂PO₄ (pH7.4), 1% SDS, 1mM EDTA) 50mlで62℃、10分間洗浄し、これをさらに4回繰り返して洗浄した後、メンブレンの放射活性をBAS2000で解析した。なお、プローブDNAは、PCR法(ロッシュ社、Expand Hi Fidelity PCR system)を用いて作製した。その際プライマーは、ATCTTGCCTTCCTCATGGC および、GTTTGGGTGAACGTGGTTCを使用し、鋳型はニワトリ抗体軽鎖遺伝子をクローニングしたプラスミド #18-4を鋳型とした。

【0022】

結果:

各濃度のTSA存在下において(0ng/ml, 0.625ng/ml, 1.25ng/ml, 2.5ng/ml)、添加するMNase(0U, 0.04U, 0.2U, 1U)量を増加させたところ、TSA濃度及びMNase量の増加に伴い、VJ領域が切断されて生じるDNA断片が出現することが確認された(図2、「VJ」で示した位置のバンド、例えば、左から第5レーン目と第17レーン目を比較する)。これらのバンドは、TSA非存在下(0ng/ml)においてMNase量を増加させても検出されなかったため(図2、左から第5レーン目)、VJ領域がMNaseに

より切断されるためには、TSAの存在が必要であることを示す。以上の結果から、TSAによりDT40細胞株のVJ領域（抗体軽鎖遺伝子座領域）のクロマチン構造が弛緩し、この領域へのMNaseのアクセシビリティが増加したことが確認された。

【0023】

実施例2：トリコスタチンA（TSA）によるDT40細胞中の抗体遺伝子座における体細胞相同組換え促進の確認

細胞培養：

DT40細胞は、CO₂ 恒温槽にて5%のCO₂、39.5℃で培養した。培地は、IMDM培地（Invitrogen社）を用い、10%FBS、1%ニワトリ血清、ペニシリン100単位/ml、ストレプトマイシン100 µg/ml、2-メルカプトエタノール 55 µMを加えて使用した。また、トリコスタチンA（和光純薬）は、メタノールに5mg/mlに溶解したものをストックとし、最終濃度が1.25 ng/mlとなるように適宜培地で希釈して用いた。

細胞表面にIgMを発現していないDT40細胞（以下、IgM(-)細胞）を、約20細胞/mlに希釈して96穴プレートに100 µlずつ分注した。この際、培地にトリコスタチンAを1.25 ng/ml加えたものと、加えないものを用意した。シングルコロニーが現れるまで培養し、5クローン（TSAなしは6クローン）を新鮮な培地2mlを入れた6穴プレートに移した。なお、この際TSA濃度は当初の濃度を維持し、細胞濃度は10⁵～10⁶ 個/mlに保ちながら培養を続けた。

【0024】

ゲノムDNAの抽出：

上述の方法により3週間培養したDT40細胞の生細胞を蛍光活性化セルソーターで回収した。EPICS ELITE ESPにより、生細胞10万個を1.5mlチューブに集めた。シース液に懸濁された細胞を遠心（1000g, 10min）により回収し、ペレットに直接300 µlのゲノム抽出バッファー（100mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mMEDTA, 0.2% SDS, 200mM NaCl 及び 100 µg/ml プロテイナーースK）を加え、50℃で一晩消化した。翌日、750 µlのエタノールを加え

、穏やかに上下に反転させて混ぜた。ゲノムDNAを遠心(1000g, 10min)により回収し、70%エタノールで洗い、風乾した。ここに100 μ lのTEバッファー(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)を加え、50℃で30分放置した後、4℃にて一晩かけて溶解させた。

【0025】

抗体軽鎖遺伝子可変領域の配列の解析:

抗体軽鎖遺伝子可変領域の増幅には、PCR (Perkin Elmer 9600) を利用した。ゲノムDNA溶液5 μ l(細胞5000個相当)を鋳型とし、プライマーは、上流(CACACCTCAGGTACTCGTTGCG)、下流(TCAGCGACTCACCTAGGACGG)それぞれ10pmolを使用した。Pyrobest DNA Polymerase(宝酒造)を用いて、50 μ lスケールで反応させた。反応条件は、98℃ 2分の後、98℃ 30秒、57℃ 30秒、72℃ 1分を27サイクル行い、最後に72℃ 5分反応させた。その後、ExTaq DNA Polymerase(宝酒造)を1 μ l加え、72℃ 15分反応させた後、全反応液の20 μ l分をアガロースゲル電気泳動で分離した。軽鎖遺伝子可変領域に相当するバンドを切り出し、Gel Extraction kit (Qiagen社)によりDNAを回収後、TOPO TA Cloning kit(Invitrogen社)にてpCR2.1-TOPOベクターに組み込み、大腸菌にトランスフォーメーションした。プラスミドを抽出し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer社)により配列を解析した。

【0026】

結果:

増幅された抗体軽鎖遺伝子可変領域を、プラスミドベクターにクローニングしたものの配列をしらべてみたところ、図3の結果が得られた。トリコスタチンAを加えて培養した細胞では、42サンプルが16種類に分類された(図3(a))。この多様性は、相同組換え、遺伝子挿入、遺伝子欠失、点変異により生じたものであることが分かった。一方、トリコスタチンA非存在下で培養した細胞では、30サンプル調べたかぎりでは、相同組換えは見い出されなかった(図3(b))。以上の解析結果より、トリコスタチンAの添加により、DT40細胞株での抗体軽鎖遺伝子の多様性が著しく上昇したと結論付けられる。

【0027】

実施例 3 : トリコスタチン A による DT 40 細胞における IgM の発現の促進
蛍光活性化セルソーター (FACS) による IgM の発現の確認:

実施例 2 に記述した方法でトリコスタチン A 処理を行った IgM (－) 細胞の約 10^6 個を含む培養液を 1.5 ml チューブにとり、遠心により該細胞を回収 ($1000g$ 、5 分) し、染色バッファー (PBS、0.3% BSA) $200\mu l$ に懸濁した。細胞を再び遠心により回収し、次に FITC ラベルした抗ニワトリ IgM 抗体 (BETHYL 社) を染色バッファーで $1/250$ 倍希釈したものを $200\mu l$ で懸濁し、氷上で 1 時間反応させた。細胞を遠心により回収し再び染色バッファー $200\mu l$ に懸濁し、これを遠心することで細胞の洗いをを行った。この洗いのステップをもう一度繰り返したのち、細胞を $5\mu g/ml$ のヨウ化プロピジウム (ナカライ社) を含む染色バッファー $100\mu l$ に懸濁した。IgM を発現している細胞の割合は、EPICS ELITE ESP (Beckman Coulter 社) により、 10000 細胞を測定して算出した。その際、ヨウ化プロピジウムにより染色される細胞は死細胞としてゲートアウトした。

【0028】

結果:

一週間おきに FACS で IgM を発現している細胞 (以下、IgM (+) 細胞) の割合を測定したところ、図 4 のように、時間依存的に IgM (+) の割合が増加するものが見られた。IgM (+) 細胞は、IgM (－) 細胞が相同組換えを起こした結果生じたと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 定常領域及びサザンハイブリダイゼーションのプロープ領域欠失変異株作製のための模式図を示す。プラスサイシン耐性遺伝子が挿入されたプラスミド (コンストラクト UR 1) を用いて、非再編成軽鎖遺伝子座の定常領域付近 (プロープ領域を含む) をプラスサイシン耐性遺伝子で置換させている。

【図 2】 抗体軽鎖遺伝子クロマチン構造の TSA 依存的なアクセシビリティの増加を示す。naked DNA とは、徐タンパクした同じ領域の DNA のことである。

【図 3】 トリコスタチン A の相同組換えへの影響を示す。

(a) トリコスタチン A 1.25 ng/ml 存在下で 3 週間培養したクローンの抗体軽鎖遺伝子可変領域の多様性を示す。

(b) トリコスタチン A 非存在下で 3 週間培養したクローン (No. 1-No. 6) の抗体軽鎖遺伝子可変領域の多様性を示す。

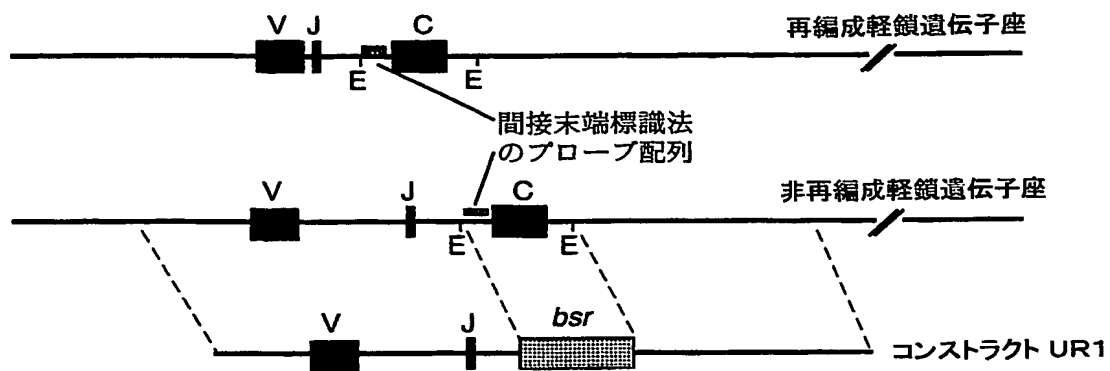
【図 4】 トリコスタチン A の IgM (+) 細胞出現頻度への影響を示す。

(a) トリコスタチン A 1.25 ng/ml 存在下で培養した 5 クローン (No. 1-No. 5) の結果を示す。

(b) トリコスタチン A 非存在下で培養した 6 クローン (No. 1-No. 6) の結果を示す。

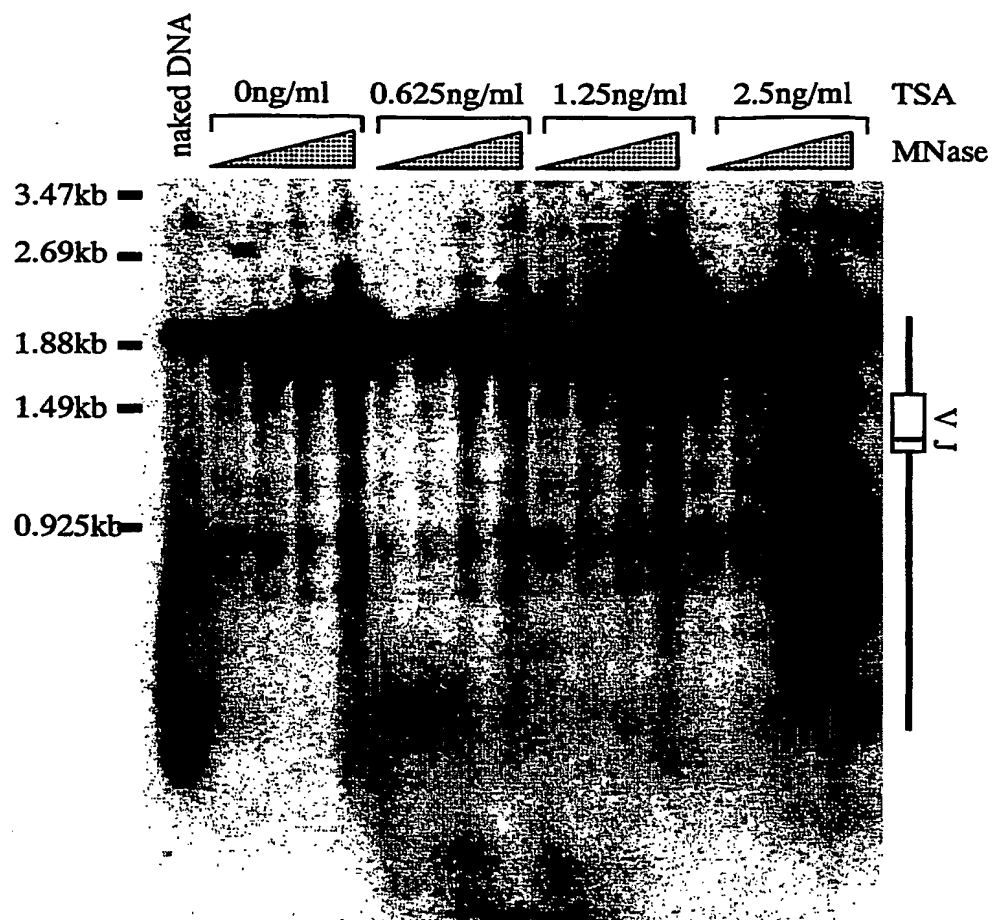
【書類名】 図面

【図 1】



V: 可変領域
J: 連結領域
C: 定常領域
E: EcoRI サイト
bsr: プラスチサイシン耐性遺伝子

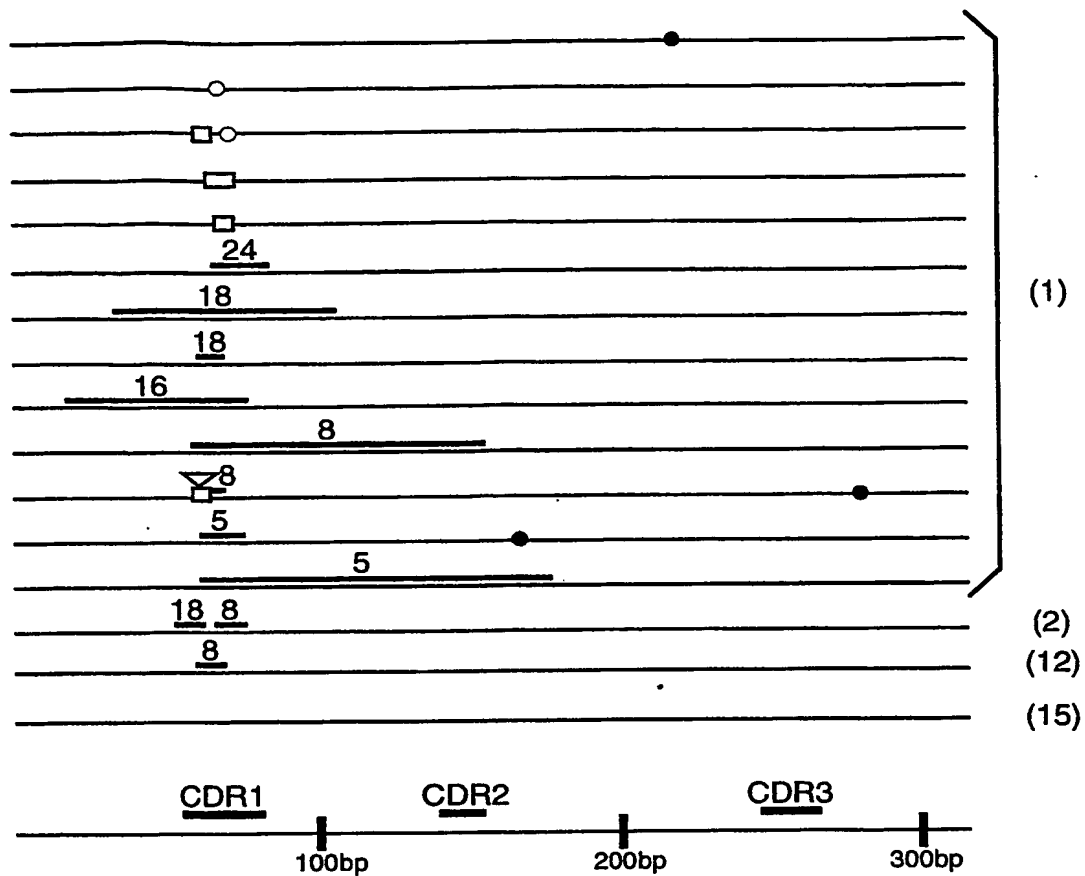
【図 2】



BEST AVAILABLE COPY

【図 3】

(a)



CDR:complementary determining region

() 内はクローンの数

— :遺伝子変換; 数字は偽遺伝子の番号

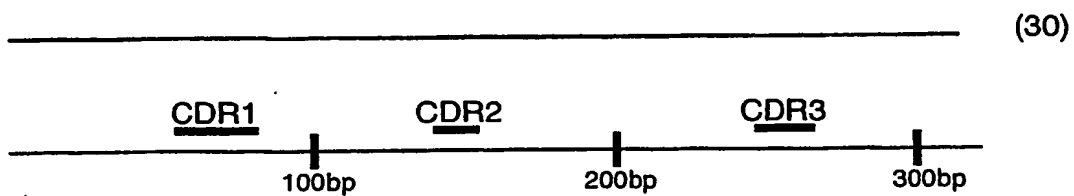
● :点変異

○ :一塩基欠失

□ :オリゴヌクレオチド欠失

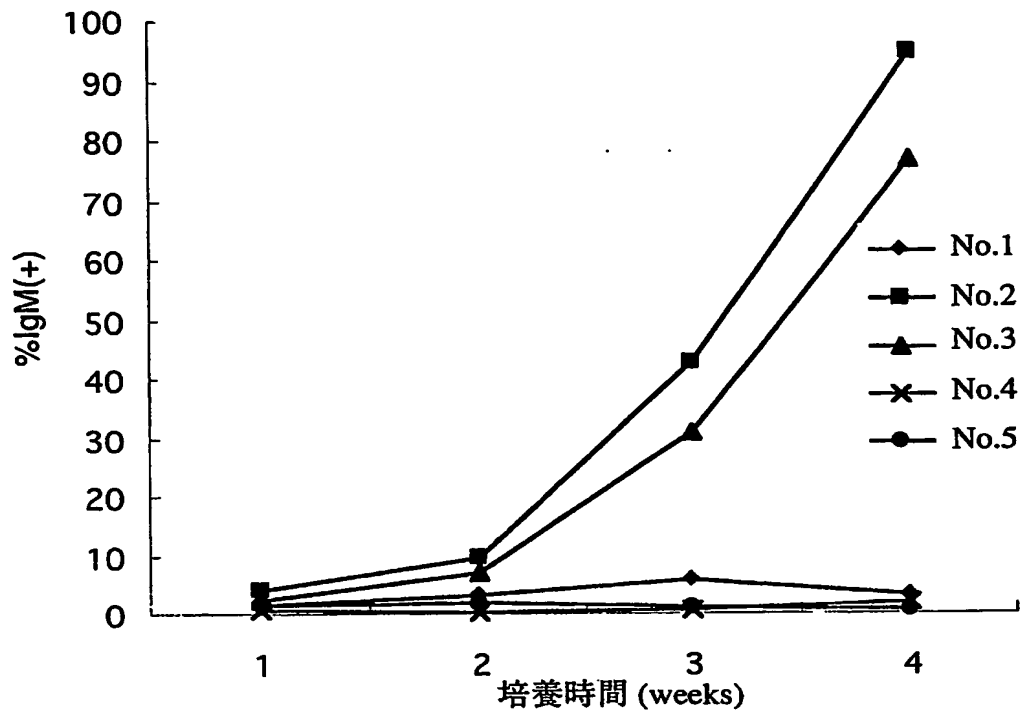
▽ :塩基挿入

(b)

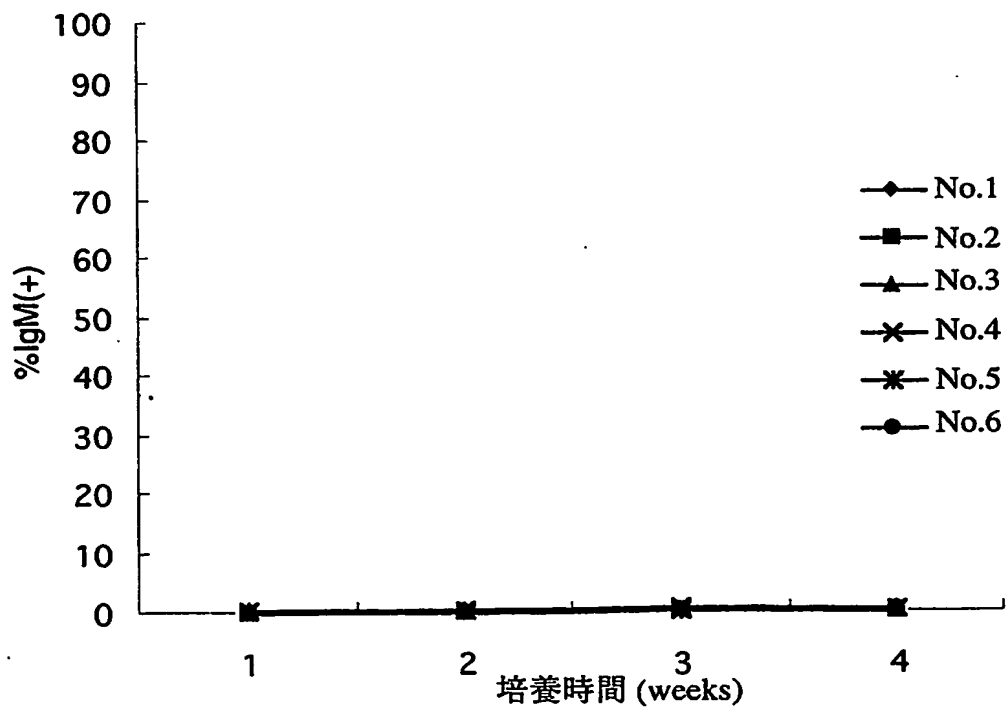


【図 4】

(a)



(b)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 免疫細胞中の抗体遺伝子座における体細胞相同組換えを著しく促進させ、その結果、抗体の多様性を獲得するための新規方法を提供する。

【解決手段】 抗体遺伝子座においてDNA相同組換えが起きている免疫細胞（例えば、DT40細胞等）をヒストンアセチル化酵素阻害剤等（例えば、トリコスタチンAなど）と接触等させることにより、当該抗体遺伝子座におけるクロマチン構造を弛緩させることで、抗体遺伝子座における体細胞相同組換えを促進し、多様な抗体分子の作製を可能にする。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 2 2 1 2 3 2
受付番号	5 0 2 0 1 1 2 3 7 3 1
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 4 年 7 月 3 1 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 7月30日
-------	-------------

次頁無

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 2 2 1 2 3 2
受付番号	5 0 2 0 1 1 2 3 7 3 1
書類名	特許願
担当官	兼崎 貞雄 6 9 9 6
作成日	平成 1 5 年 5 月 2 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成 1 4 年 7 月 3 0 日
-------	--------------------

次頁無

特願 2002-221232

出願人履歴情報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1990年 8月28日
新規登録
埼玉県和光市広沢2番1号
理化学研究所

特願 2 0 0 2 - 2 2 1 2 3 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 2 月 2 4 日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

科学技術振興事業団